

学校编码: 10384

密级\_\_\_\_\_

学号: 24520091152929

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

缝隙连接蛋白43在脂肪干细胞  
抗叔丁基过氧化氢损伤中的作用

The protective function of Connexin43 on  
adipose derived stem cell when exposed  
to tert-butyl hydroperoxide induced injury

陈晓敏

指导教师姓名: 王挹青 教授

专 业 名 称: 内科学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩日期: 2012 年 5 月

2012 年 5 月

缝隙连接蛋白43在脂肪干细胞抗氧化应激损伤作用的观察研究

陈晓敏

指导教师

王挹青教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 摘 要

背景及目的：通过基因修饰的方法实现对干细胞生物学特性的改造，是保证移植细胞存活及增殖能力的重要手段，也是减少干细胞移植相关心律失常事件的重要手段。既往的研究证实通过上调Cx43的表达，可产生抗心律失常作用。本研究将明确Cx43基因转导ADSC可否提高T-booh损伤后ADSC细胞的存活率

方法：构建 Connexin43 和 GFP 双基因共表达的重组慢病毒载体质粒，脂质体转染法包装产生慢病毒颗粒。携带目的基因病毒颗粒感染 ADSCs 构建工程干细胞，运用流式细胞仪、荧光显微镜、Western blotting、RT-PCR 检测等鉴定 ADSC 细胞以及 ADSC 中 Cx43 蛋白的表达情况。随后在叔丁基过氧化氢（tert-butyl hydroperoxide, T-B00H）处理培养条件下，采用 CCK8 方法观察检测各组细胞的存活率。

结果：成功构建了慢病毒载体质粒，成功分离、培养及鉴定了 ADSC 细胞。转导 Cx43 基因后，通过荧光定量 PCR、WB 的方法证实了在干细胞中 Cx43 在 mRNA 水平和蛋白水平上成功表达。功能学研究证实，过表达 Cx43 基因的 ADSC 细胞可明显抑制 T-B00H 诱导处理后的细胞的生存率减少问题。

结论：证实了携带 Cx43 基因的慢病毒载体能够在 ADSC 细胞中有效表达，Cx43 可以调节 ADSC 在 T-B00H 损伤下促生存的保护作用。

**关键词：** 缝隙连接 43；脂肪干细胞；T-BOOH

## Abstract

**Objective:** The transfection of target gene before transplantation could enhance the therapeutic effect of stem cells. Genetic modification methods for the transform of stem cells biology characteristics, as a major approach to ensure survival and proliferation capacity of transplant cells, could also significantly reduce the stem cell transplantation related arrhythmia events. At present, it's widely believed that upregulated Connexin43 (Cx43) expression could have the anti-arrhythmic effect. In this study, we aim to demonstrate that whether the cx43 gene transfection could protect adipose stem cells when exposed to tert-butyl hydroperoxide induced injury.

**Methods:** Polymerase Chain Reaction and Restriction endonuclease digestion were used to construct Cx43 and green fluorescence protein (GFP) gene co-expression lentivirus. Liposome was applied for transfection of HEK293T cells and packaging of lentivirus. The viral supernatant was used to transfect ADSCs. Then, flow cytometry, fluorescence microscope, Western blotting and Real-Time PCR were used to identify the expression of Cx43 gene on ADSCs. Then, we applied CCK8 method to observe the cell survival of Cx43-transfected ADSCs, which was pretreated by the chemical oxidant tert-butyl hydroperoxide (T-BOOH).

**Results:** We successfully constructed the lentiviral vectors plasmid, then separated, cultured and identified the ADSCs. Real-Time PCR and Western blotting analysis showed the mRNA and protein expression of Cx43 in ADSCs after transfection. In our study, after transfection of Cx43 gene, ADSC cells showed the significant increase of cell survival induced by T-BOOH.

**Conclusion:** Lentivirus vectors carried with Cx43 gene could be successfully expressed in ADSC cells. Moreover, Cx43 showed effects of promoting cell survival in ADSCs during the injury induced by T-BOOH.

**Keywords:** Connexin43; Adipose derived stem cells; Tert-butyl hydroperoxide

# 目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章 前言	1
1.1 基因修饰干细胞治疗缺血性心脏病	1
1.1.1 缺血性心脏病治疗现状	1
1.1.2 基因修饰治疗	1
1.1.3 绿色荧光蛋白GFP作为报告基因的优势	2
1.2 脂肪干细胞	2
1.2.1 脂肪干细胞的生物学特征	2
1.2.2 脂肪干细胞治疗缺血性心肌病优势	3
1.3 Cx43 的结构与生物学功能	4
1.3.1 缝隙连接 43 结构特点	4
1.3.2 CX43 生物学功能	4
1.4 本研究的思路、目的和意义	5
第二章 缝隙连接蛋白 43 对脂肪干细胞抗氧化应激损伤作用的观察研究	7
2.1 材料	7
2.1.1 仪器	7
2.1.2 实验动物	7
2.1.3 细胞和质粒	7
2.1.4 主要试剂	8
2.1.5 Cx43 和 EGFP 基因的 PCR 引物	10
2.2 方法	11
2.2.1 pBobi-Cx43-GFP、pBobi-GFP 重组慢病毒载体质粒的构建和鉴定	11

2.2.2	质粒转染 293T 细胞及慢病毒滴度结果测定 .....	14
2.2.3	大鼠脂肪干细胞的分离及培养鉴定 .....	16
2.2.4	慢病毒感染靶细胞 ADSC 及鉴定 .....	18
2.2.5	CCK8 检测各组细胞存活率情况 .....	21
2.2.6	统计学处理 .....	22
<b>2.3</b>	<b>实验结果 .....</b>	<b>22</b>
2.3.1	pBobi-Cx43-GFP、pBobi-GFP 重组慢病毒载体构建和鉴定 .....	22
2.3.2	质粒转染 293T 细胞及慢病毒滴度测定结果 .....	24
2.3.3	ADSC 的培养与鉴定 .....	26
2.3.4	慢病毒感染 ADSC 结果与鉴定 .....	28
2.3.5	CCK8 实验检测 TBOOH 处理后各组 ADSC 的存活率情况 .....	30
<b>2.4</b>	<b>讨论 .....</b>	<b>31</b>
<b>2.5</b>	<b>结论 .....</b>	<b>35</b>
	<b>参 考 文 献 .....</b>	<b>36</b>
	<b>英文缩略词表 .....</b>	<b>39</b>
	<b>综述 .....</b>	<b>40</b>
	<b>致谢 .....</b>	<b>50</b>

# Table of Contents

<b>Abstract in Chinese .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Gene-modified Stem Cells in treating ischemic heart disease .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Current therapeutic strategies for ischemic heart disease .....	1
1.1.2 Gene modification therapy .....	1
1.1.3 Advantages of GFP as a report gene .....	2
<b>1.2 Adipose tissue-derived stromal cells .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Biological characteristics of ADSCs .....	2
1.2.2 Advantages of ADSCs in therapies for IHD .....	3
<b>1.3 Structure and Biological function of Cx43 .....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Structure of Cx43 .....	4
1.3.2 Biological function of Cx43 .....	4
<b>1.4 Mentality, Aims and Significance of Paper .....</b>	<b>5</b>
<b>Chapter 2 The Protective Effect of Functional Connexin43 on Adipose derived stem cell when Exposed to Oxidative Stress .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>7</b>
2.1.1 Instruments .....	7
2.1.2 Animals .....	7
2.1.3 Cells and Plasmids .....	7
2.1.4 Reagents .....	8
2.1.5 PCR primers for Cx43 and EGFP .....	10
<b>2.2 Method .....</b>	<b>11</b>
2.2.1 construction and identification of lentiviral vectors plasmid .....	11
2.2.2 Lentiviral titer detection .....	14
2.2.3 Isolation, culture and verification of ADSCs .....	16



2.2.4	Infection and verification of ADSCs.....	18
2.2.5	CCK8 methods for the evaluation of cell viability in ADSC.....	21
2.2.6	Statistical Analysis.....	22
<b>2.3</b>	<b>Result .....</b>	<b>22</b>
2.3.1	Construction and identification of lentiviral vectors .....	22
2.3.2	Cell transfection and Lentiviral titer results .....	24
2.3.3	Culture and verification of ADSCs .....	26
2.3.4	Infection and verification of ADSCs.....	28
2.3.5	Result of CCK8 .....	30
<b>2.4</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>31</b>
<b>2.5</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>35</b>
	<b>References .....</b>	<b>36</b>
	<b>Abbreviation .....</b>	<b>39</b>
	<b>Review .....</b>	<b>40</b>
	<b>Acknowledgments .....</b>	<b>50</b>

## 第一章 前言

### 1.1 基因修饰干细胞治疗缺血性心脏病

#### 1.1.1 缺血性心脏病治疗现状

缺血性心脏病IHD (Ischemic heart disease)常并发心肌缺血和坏死, 心肌细胞坏死或凋亡后, 少量再生难以满足心肌修复需要, 导致心室重构、心律失常并最终出现心力衰竭。常用的治疗手段包括内科药物治疗、介入治疗和外科手术治疗, 但均难以解决上述问题, 心脏移植术是从根本上解决上述问题的方法, 但受到供体来源、免疫因素的限制。虽然近年来因治疗方法的改进心梗存活率明显提高, 但对于梗死区坏死心肌或无功能心肌仍然还没有理想的治疗方法。干细胞移植作为一种新兴的生物学方法为缺血性心血管疾病的治疗提供了一个新的领域。但胚胎干细胞移植涉及到伦理学问题。骨骼肌卫星细胞和骨髓干细胞均属于成体多能干细胞, 可以进行自体移植, 避免了上述问题, 但骨骼肌卫星细胞与宿主心肌细胞之间不能形成很好的电机械耦联, 有潜在的致心律失常风险。早期, 有学者采用异体细胞包括胎心细胞和胚胎干细胞进行心肌移植试验取得一定的效果, 但其应用受到免疫及伦理学因素的影响。目前大量研究表明干细胞移植治疗缺血性心脏病前, 将目的基因转染干细胞可增强干细胞治疗效果, 同时选择适当的基因和载体细胞很关键。

#### 1.1.2 基因修饰治疗

心血管疾病的生物学治疗——细胞和基因治疗处于早期临床研究阶段, 基因治疗总体来说受载体携带新基因物质的安全性方面限制(尤其是病毒载体), 但基因治疗是未来干细胞治疗的关键, 它可通过基因调控方式控制干细胞功能强化、增殖和分化以克服干细胞治疗的缺陷, 二者完美结合可能是未来全新的治疗模式。干细胞移植治疗心血管疾病的一个瓶颈问题是如何提高移植细胞的存活率。许多研究<sup>1-4</sup>表明基因修饰后的干细胞能提高细胞移植存活率和治疗效果。目前存在的一个关键问题是选择合适的基因对干细胞进行修饰, 这是提高细胞的移植存

活率和治疗效果的一条有效途径。治疗缺血性心脏病的理想的基因修饰方案应至少包括两方面:一是增强移植干细胞存活率,以充分发挥干细胞多向分化能力在缺血性心脏病中的作用;二是促进血管新生,改善缺血心肌的血液供应。参与血管新生或血管生成有关的基因包括血管内皮细胞生长因子(vEGF)、血管生成素-1(Ang-1)、碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、肝细胞生长因子(HGF)等。国内外已有较多研究<sup>1-4</sup>应用上述基因修饰 MSC 治疗缺血性心脏病的基础研究,大多取得了较为肯定的结果,此外针对 BMSCs 的存活能力降低,应用抗凋亡基因修饰它,目前也取得了令人可喜的成绩, Jiang<sup>5</sup> 等将 Akt 基因导入骨髓 MSc 后移植损伤心脏,该策略能够明显提高干细胞存活效率,并使心功能获得明显的改善。Yu, YLi W<sup>6</sup>等在骨髓 MSc 中转染抗凋亡基因 AKt、Bcl-2,发现 AKt 或 Bcl-2 基因修饰 ADSCs 具有更好的存活和分化能力。

基因修饰也是改善细胞移植存活率的有效途径。基因修饰的方法在缺血性心脏病治疗上可以有改善血流、再生心肌的效果。对于缺血性心脏病来讲还有一个重要问题就是干细胞移植后促进心律失常的发生。选择一个合适的基因来减少干细胞移植后心律失常的发生至关重要。

### 1.1.3 绿色荧光蛋白GFP作为报告基因的优势

与传统的筛选方法相比 GFP 具有很多优点,如具有简单、快速、方便、实现了活细胞内基因表达和定位、荧光发射无种属依赖性、荧光为蛋白的内在属性、荧光信号对光漂白具有高抗性、检测时不需要附加辅助因子、在细菌和真核细胞中表达具有高度稳定性、无明显毒性等优点。EGFP 是增强型绿色荧光蛋白。

## 1.2 脂肪干细胞

### 1.2.1 脂肪干细胞的生物学特性

ADSCs 是一类来源于中胚层或神经外胚层的成体干细胞。体外培养的 ADSCs 形态类似纤维母细胞,贴壁生长。ADSCs 的免疫表型与 BMSCs 极为相似。流式细胞术分析发现它们都表达 CD29、CD44 和主要组织相容性复合体 I。不表达 CD34、CD45 和主要组织相容性复合体 II。在特定的培养条件诱导下,ADSCs 不仅可以

分化为中胚层来源的细胞如成骨细胞、软骨细胞等,还可以诱导分化为血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和心肌细胞等。体外培养的 ADSCs 分泌多种细胞因子,例如, VEGF (VEGF)、肝细胞生长因子(HGF)等<sup>7, 8</sup>。由于 ADSCs 不仅具有干细胞的共性,而且具有取材便捷、体外扩增能力强、无传播疾病的危险、无年龄限制、无伦理学争议、可自体回输从而避免了免疫排斥反应等优点,不仅如此,ADSCs 还是良好的细胞载体,可同时携带目标基因进行转染治疗。被认为是细胞工程和基因工程理想的种子细胞,已成为干细胞研究领域的热点<sup>7</sup>,被广泛应用于各系统疾病的治疗研究。

### 1.2.2 脂肪干细胞治疗缺血性心肌病优势

我们选择 ADSC 做为研究对象,主要基于以下几点考虑:第一、ADSCs 由于具有取材便捷、体外扩增能力强、基因转染效率高、转染后稳定表达、无传播疾病的危险、无年龄限制、无伦理学争议、且具免疫抑制等特点,而被认为是细胞工程和基因工程理想的种子细胞。第二,国内外许多研究小组开展了 BMSCs 治疗缺血性心脏疾病的研究,初步结果显示 BMSCs 治疗可以改善左心室功能和血液动力学参数。虽然骨髓的获得并不算困难,但是,仍然会给患者带来一些不必要的麻烦,如骨穿引起的疼痛,经常要求一般或椎管麻醉,同时产生的 BMSC 数量很低,从实际应用角度来说,低数目的干细胞必然要求体外扩增才能达到临床上有意义的干细胞数,此步骤不仅费时而且不经济,同时细胞易受损失,更容易受到污染。此外 BMSCs 移植治疗本身的各种功能还受供者来源年龄和组织的影响限制等。而理想的自体干细胞①易于获得;②获取过程中患者人无不适感或轻微不适感;③不经过体外的高度培养和扩增就能产生足够量的细胞数目,脂肪中的 MSC 细胞即 ADSC 完全符合以上要求,它代表着 BMSC 的选择性来源,必将在组织工程及基因治疗方面发挥作用。第三,最近研究 ADSCs<sup>9</sup>治疗缺血性心脏显示其能改善心功能的作用。ADSCs 治疗缺血性心脏疾病可能机制有:一、促心肌细胞再生;二、抗心肌细胞凋亡;三、促血管修复与再生。其中促血管修复与再生作用的机制有:1、ADSCs 能作为血管支持细胞参与血管再生,主要分化为血管内皮细胞参与血管修复;2、ADSCs 免疫抑制和对血管的抗炎作用。3、ADSCs 分泌生长因子促进血管的再生和生长。研究<sup>7, 8</sup>证实 ADSCs 不仅能够分化为心肌细胞使 IHD 坏死心

肌再生,而且还通过旁分泌途径分泌各种血管生长因子参与血管修复,且注射ADSCs只特异的归巢至损伤部位,而不粘附于健康、完整的血管表面,这正好对IHD的病变血管具有一定的靶向治疗作用。因此脂肪干细胞很可能将成为缺血性心脏病患者理想的选择。

### 1.3 Cx43 的结构与生物学功能

#### 1.3.1 缝隙连接蛋白 43 结构特点

根据种属及分子量的不同,已命名的Cx家族有21个成员,它们在各种组织中表达中有一定的组织特异性及呈交叉现象。目前已知间隙连接蛋白家族成员中Cx43是一种主要的细胞间隙连接蛋白,connexin43蛋白的cDNA序列在1987年首次克隆成功,全长2768 bp,开放阅读框包括1146 bp可合成含382个氨基酸的蛋白质,相对分子质量为43036。Cx43蛋白广泛存在于哺乳动物各器官、组织中,其分子结构和功能特点决定了它与机体许多病理生理过程有密切的联系其中心脏缝隙连接43是心肌细胞间的一类特殊膜结构,其主要位于心肌细胞闰盘纵位部分,其通道具有亲水性,低电阻性和低选择性等特点,其功能主要是为细胞间电信号传导提供通道,以保证动作电位的传播。构成心肌细胞间缝隙连接的蛋白有三种,即CX43、CX40和CX45。通过对于19种编码缝隙连接蛋白的连接蛋白基因的测定,结果显示Cx43是不同细胞中表达最丰富的一种。

#### 1.3.2 Cx43 的生物学功能

Cx43 的功能是目前所有间隙连接蛋白研究最多,也是最深入的一个。现主要讨论它的以下两点作用:(1)抗心律失常作用:有研究表明,缝隙连接在功能、密度、以及分布上的重构与心律失常的发生密切相关。在正常心室肌,Cx43呈簇状分布于闰盘中,而心肌梗死后,正常心室肌与梗死瘢痕灶交界的边缘区Cx43的分布模式发生了明显的改变,紊乱散在分布于细胞的侧对侧连接处,而闰盘处的Cx43则明显减少。Cx43的分布紊乱是折返形成的重要原因,从而引起心律失常。目前有多项研究表明cx43过表达可以产生抗心律失常作用。2005年,Ando<sup>10</sup>等报道当人为刺激迷走神经时,它可通过阻止缺血时Cx43的去磷酸化

从而产生抗心律失常作用。Roell<sup>11</sup>等发现胚胎心肌细胞和转基因过表达 Cx43 的骨骼肌细胞具有显著的降低室性心律失常作用, 这表明 Cx43 的过表达对梗死后心律失常的发生与防治具有特别重要的作用。2006 年, Kuhlmann<sup>12</sup> 等研究了 G-CSF/SCF 减少心梗后心律失常的机制, 发现其是通过上调 Cx43 的表达从而产生抗心律失常作用。(2) 抑制细胞凋亡: 近年的许多研究表明 cx43 具有调节细胞的生长和凋亡能力。Lu G, Haider HK、Wang Y<sup>13</sup> 等研究示 cx43 基因具有促进干细胞的增殖和存活能力, 在急性心梗中发挥重要的保护角色。Boengler K<sup>14</sup> 等发现在老龄小鼠中心肌缺氧后缺乏自我保护作用是由于缝隙连接 cx43 减少的原因。Rodriguez-Sinovas<sup>15</sup> 等示 cx43 基因具有调节心肌细胞能量代谢, 使其耐受缺氧来保护心肌作用。Wang D<sup>16</sup> 等研究表明 cx43 基因具有提高骨髓间充质干细胞在缺血缺氧条件下或移植心梗模型动物后的抗凋亡能力。凋亡在调节机体正常发育和维持内环境稳定中发挥着重要作用, 在心血管系统, 凋亡参与早期心脏和血管结构的形成, 调节后期心血管组织生长发育阶段的分化。因此, 凋亡是心血管系统发育中不可缺少的一个环节。发育成熟后的也即成年的心脏与其他的器官和组织不同, 是由末端分裂的胞组成, 它们不再具备分裂增殖能力, 心肌细胞的死亡不能通过有效的细胞增殖来弥补, 因此, 由凋亡造成的心肌细胞死亡最终会导致诸如心肌梗死、心肌病、心肌肥大、心衰等多种心脏疾病。CX43 的这一功能有望成为治疗缺血性心脏病新的治疗策略。

#### 1.4 本研究的思路、目的和意义

实验证明在动物和人的细胞移植应用的限制包括移植后细胞的低存活力和细胞的增殖能力低下。如何解决这个问题呢? 如何能充分发挥脂肪干细胞的优势呢, 目前认为通过基因修饰等方法实现对干细胞生物学特性的改造, 是调节并减少干细胞移植相关心律失常事件的重要手段, 也是保证移植细胞存活及增殖能力的重要手段。目前已基本明确通过上调 Cx43 的表达从而产生抗心律失常作用。Cx43 基因修饰是否能够通过促进脂肪干细胞增殖并抑制其凋亡的作用来进一步发挥其优势。因此本实验中拟通过基因修饰的方法, 通过构建 cx43 基因修饰脂肪干细胞, 来调节脂肪干细胞之间、脂肪干细胞与正常心脏组织之间缝隙连接的形成; 改善移植干细胞与心脏组织间生物电活动的协调性. 来探讨以慢病毒为载体

介导 cx43 基因、基因修饰 ADSC 的可行性和表达的稳定性，以及 cx43 调节 ADSC 在 TB00H 处理后具有促存活作用。国内外尚无类似研究，因此具有极大的应用前景，

意义：已有研究证明 cx43 具有明确的抗心律失常作用，脂肪干细胞移植治疗缺血性心脏病具有明确的治疗作用。两者的有效结合成为缺血性心脏病治疗的“黄金搭档”，并且为减少干细胞移植相关心律失常事件的发生，以及为改善心肌缺血事件长期预后提供理论依据，为未来缺血性心脏病治疗的提供更好的治疗前景。

## 第二章 缝隙连接蛋白 43 基因修饰在脂肪干细胞 抗叔丁基过氧化氢损伤中的作用研究

### 2.1 材料

#### 2.1.1 仪器

CO<sub>2</sub>培养箱（美国 Forma 公司），TE2000 倒置荧光显微镜（日本 Nikon 公司），生物安全柜（美国 Baker 公司），垂直洁净工作台（上海淀山湖净化设备厂），隔水式电热恒温培养箱（上海市跃进医疗器械一厂），5415D 型台式高速离心机（德国 Eppendorf 公司），超速离心机（美国 Beckman Coulter 公司），低温有轨摇床（美国 Forma 公司），THZ-C 恒温振荡器（江苏太仓实验设备厂），7500 型荧光定量 PCR 仪（ABI，美国），HV-110 型全自动高压蒸汽灭菌器（日本 HIYARAMA 公司），AB104-N 型电子分析天平（上海梅特勒·托利多公司），超低温冰箱（美国 Harris 公司），PowerPac300 型电泳仪（美国 Bio-Rad 公司），核酸蛋白检测仪（德国 Eppendorf 公司），Sunrise 型酶标仪（奥地利 TECAN 公司），Columbus Plus 型自动洗板机（TECAN 公司），TE77 型半干电转移系统（瑞典 Amersham 公司），垂直电泳槽（美国 Biorad 公司），微量加样器（Eppendorf，德国）。Odyssey 扫描膜仪（LI-COR 公司），流式细胞仪（Beckman Coulter, Fullerton, CA），水浴温控仪上海精宏实验设备有限公司电热。

#### 2.1.2 实验动物

健康 SD(Sprague-Dawley, SD)大鼠，雌雄不拘，体重 80~100g，购自厦门大学动物实验中心。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》要求。

#### 2.1.3 细胞及质粒

HEK293T 细胞（美国 invitrogen 公司）。

载体质粒 PNL-BOBI-EGFP、包装质粒 pMDL、pRSV 包膜质粒 pVSVG 赠自厦大传染病诊断疫苗中心实验室。PCMV-XL-Cx43 质粒购自美国 invitrogen 公司。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库